

2次元電気泳動法と等電点電気泳動法によるアポ蛋白Eの イソ蛋白とその phenotype の検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任：竹田亮祐教授)

渡 辺 彰

(昭和59年9月25日受付)

2次元電気泳動法と等電点電気泳動法により、アポ蛋白Eのイソ蛋白と、その phenotype について検討した。対象は健康人24例、高脂血症48例、家族性3型高脂血症6例であり、平均年齢は 48 ± 11 (SD) 才であった。超速心法により分離した超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 中のアポ蛋白Eを検討した。まず、2次元電気泳動法による検討により、アポ蛋白Eは分子量と荷電の差から多くのイソ蛋白に分離された。アポ蛋白Eイソ蛋白の泳動像からE4/4, E3/3, E2/2, E4/3, E3/2, E4/2の6種類の phenotype が存在した。家族性3型高脂血症6例のアポ蛋白E phenotype は、すべてE2/2であった。健康人と高脂血症患者の72例のアポ蛋白E phenotype の内訳は、E4/4=7%, E3/3=42%, E2/2=0%, E4/3=29%, E3/2=21%, E4/2=1%であった。最近の遺伝学的検討からアポ蛋白E phenotype は3種類の対立遺伝子 $\epsilon 4, \epsilon 3, \epsilon 2$ から規定されると考えられている。すなわち、このような対立遺伝子の homozygote は、phenotype E4/4, E3/3, E2/2であり、また、heterozygote はE4/3, E3/2, E4/2で、対応する genotype は $\epsilon 4/\epsilon 3, \epsilon 3/\epsilon 2, \epsilon 4/\epsilon 2$ である。このような遺伝形式に基づき遺伝子頻度を算出すると、 $\epsilon 4=0.22, \epsilon 3=0.67, \epsilon 2=0.11$ であった。3型高脂血症の75%が phenotype E2/2であり、4型高脂血症の17%が phenotype E4/4であった。アポ蛋白E phenotype と血清リポ蛋白脂質組成との関係を見ると、phenotype E2/2において、VLDL-Chol, IDL-Chol, および VLDL-Chol/VLDL-TG 比が最も高値を示し、反対に、LDL-Chol は最も低値であった。次に、等電点電気泳動法による検討では、アポ蛋白EはE4, E3, E2, E1の4個の主要イソ蛋白に分離された。イソ蛋白の組成を検討することにより、6種類のアポ蛋白E phenotype が判定できた。等電点電気泳動法により診断したアポ蛋白E phenotype の92%が2次元電気泳動法による phenotype と一致した。phenotype E2/2はイソ蛋白E4とE3を認めないことから、また、E4/2はmajor isoprotein がE4とE2であることから容易に判定できた。phenotype E4/4とE4/3はイソ蛋白E4/E3比から鑑別され、phenotype E4/4でE4/E3比は1.1より高値であった。また、phenotype E3/3とE3/2はイソ蛋白E3とE3/E2比から鑑別され、phenotype E3/3でイソ蛋白E3は39.5%より高値で、E3/E2比は1.1より高値であった。以上の結果より、家族性3型高脂血症の診断に関してアポ蛋白Eのイソ蛋白と phenotype の検討が重要であり、等電点電気泳動法によりアポ蛋白Eの phenotype の判別が可能であることがわかった。

Key words familial type 3 hyperlipoproteinemia, apolipoprotein E, two-dimensional electrophoresis, isoelectric focusing

家族性3型高脂血症 (familial type 3 hyperlipoproteinemia, familial dysbetalipoproteinemia) は血清コレステロール (cholesterol, Chol) と中性脂肪 (triglyceride, TG) が増加し、特異的なリポ蛋白であ

る β ・超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) の出現を特徴とする¹⁻⁴⁾。さらに、皮膚黄色腫、冠および末梢動脈硬化症をとともなう遺伝性疾患である¹⁻⁴⁾。血清脂質の増加はTG rich lipo-

Abbreviations: Chol, cholesterol; HDL, high density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein.

protein (カイロミクロン, VLDL) のレムナント (remnant) の増加による⁵⁻⁸⁾。

アポ蛋白 E は, 1973 年, Shore ら⁹⁾により, はじめて ヒト VLDL 中に発見されたが, この蛋白は主として TG rich lipoprotein に含まれる。その役割は, 肝に存在するアポ E レセプター (receptor) によるレムナントの取り込みを仲介すると考えられている^{10,11)}。近年, アポ蛋白 E の等電点電気泳動法や 2 次元電気泳動法による検討から, アポ蛋白 E は 6 種類の phenotype に分類され, 家族性 3 型高脂血症のアポ蛋白 E は最も酸性の等電点をもつ異常蛋白であることが明らかとなった¹²⁻¹⁵⁾。

アポ蛋白 E の phenotype に関しては, 2 次元電気泳動法と等電点電気泳動法を比較した報告も, 日本での phenotype の検討も少ない。そこで, 著者は, 2 次元電気泳動法と等電点電気泳動法を用い, アポ蛋白 E のイソ蛋白 (isoprotein) とその phenotype について検討した。

対象および方法

1. 対象

健康人 24 例, 高脂血症 48 例, 家族性 3 型高脂血症 6 例の計 78 例を選んだ。男性 43 例, 女性 35 例で, 年齢は 21 才から 68 才で, その平均土標準偏差 (SD) は 48 ± 11 才である。高脂血症の判断の基準は血清 Chol ≥ 230 mg/dl, または, 血清 TG ≥ 160 mg/dl とした。

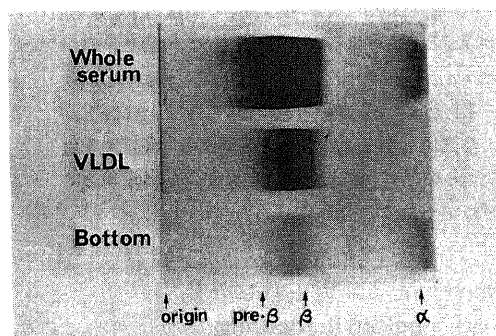


Fig. 1. Electrophoretic patterns of the β -VLDL. Agarose gel electrophoresis was performed on the whole serum, the supernatant ($d < 1.006$ g/ml, middle) and infranant ($d > 0.006$ g/ml, bottom) fractions obtained by preparative ultracentrifugation of plasma. The LDL (β -LP) and HDL (α -LP) were found in the bottom fractions. The VLDL showed β -mobility rather than the usual pre β -mobility. The β -VLDL caused a broad- β band on the electrophoresis of whole serum. The cathode is on the left, and the anode on the right of the photograph.

2 次性高脂血症をきたす肝, 腎疾患, 糖尿病, 甲状腺疾患をもつ症例は除外した。家族性 3 型高脂血症の診断は以下の基準をすべて満足するものとした。①アガロース電気泳動法による血清リポ蛋白像が broad β -band を示し, β -VLDL を認める (図 1), ② VLDL-Chol/血清 TG 比 ≥ 0.30 ¹⁶⁾, または, VLDL-Chol ≥ 55 mg/dl かつ VLDL-Chol/VLDL-TG 比 ≥ 0.33 ¹⁷⁾, ③等電点電気泳動法によりアポ蛋白 E3 の欠損の証明¹²⁾。

2. 血清リポ蛋白の分離

採血は 12 時間以上絶食後早期空腹時に行なった。室温にて血清を分離後, 4°C に保存した。血清リポ蛋白の分離は Havel ら¹⁸⁾の方法に従い, 超速心法にて行なった。まず, 血清 2 ml をセルロースナイトレートチューブに入れ, さらに, 0.01% EDTA を含む比重 1.006 の NaCl 液 3.5 ml を重層した後, Beckman L5-50, 分析用超速心機 40.3 rotor で 10°C , 40000 回転で 20 時間遠心後, 上層 1.5 ml を採取し, VLDL 分画を得た。次に, 下層 4 ml に 1.5 ml の NaCl 液を加え比重 1.019 とし, 10°C , 40000 回転で 24 時間遠心後, 上層 1.5 ml を採取し, 中間型比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) 分画を得た。さらに, 下層 4 ml に 1.5 ml の KBr 液を重層し比重 1.063 とし, 10°C , 40000 回転で 30 時間遠心後, 上層 1.5 ml を採取し, 低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 分画を得た。下層は高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) とした。

3. 血清リポ蛋白電気泳動と血清脂質の測定

血清リポ蛋白電気泳動は Noble¹⁹⁾の方法に従い, アガロースゲルを用いた。血清脂質組成と泳動パターンから, 1 型, 2a 型, 2b 型, 3 型, 4 型, 5 型の高脂血症型を判定した²⁰⁾。血清脂質の測定は, Chol は酵素法²¹⁾, TG は Fletcher 法²²⁾にて行なった。

4. Apo VLDL の分離

血清 2~4 ml に比重 1.006 の NaCl 液を加え, 前述と同様に超速心し上清の VLDL 分画を採取した。再度, 比重 1.006 の NaCl 液を加え超速心後, VLDL 分画を採取し, 次に下記に述べる操作で脱脂処理を行なった。約 5 倍量のアセトン・エタノール (V/V=1/1) と混和, -15°C , 4 時間静置後, 室温にて遠心し上清を除いた。再び同溶液を混和, -15°C , 2 時間静置後遠心し上清を除いた。次に, ジエチルエーテルを加え混和, -15°C , 1 時間静置後遠心し上清を除き, 窒素ガス下で蛋白部分を乾燥させ, apo VLDL を得た。泳動を行なうまで -20°C に保存した。

5. 2 次元電気泳動法

2 次元電気泳動法は O'Farrell²³⁾および Zannis ら¹³⁾の方法に従った。この方法は, はじめに等電点電気泳

動を行ない、次いで、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行なう方法である(図2)。等電点電気泳動法のゲル管には内径2.5 mm、長径130 mmのガラスチューブを用いた。泳動試料の apo VLDL の蛋白量は40~60 μ gとした。SDS ポリアクリルアミド電気泳動

法は垂直型平板ゲルを用い、厚さ0.75 mm、170×200 mmの大きさのものを使用した。泳動後固定、染色した後、蛋白のバンドが鮮明に認められるまで脱色した(図2)。

6. 等電点電気泳動法

等電点電気泳動法は Warnick ら²⁴⁾の方法に従った(図3)。ゲル管は内径8 mm、長径100 mmのガラス管で、泳動試料の apo VLDL は200 μ gとした。泳動後固定、染色した後、蛋白のバンドが鮮明に認められ

First dimension(isoelectric focusing)

Apo VLDL dissolved in a solution of 9.5 M urea, 2%(W/V) Nonidet P-40, 2.1% ampholine(1.2% pI5-8, 0.5% pI2.5-4, 0.4% pI4-6) and 5% β -mercaptoethanol. Gel: 9 M urea, 4% polyacrylamide(3.8% acrylamide, 0.2% bisacrylamide), 2.1% ampholine(1.2% pI5-8, 0.5% pI2.5-4, 0.4% pI4-6).

Focusing was carried out at 4°C and 400 V for 22 hrs.

Gel was shaken in a solution of 10%(W/V) glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 2.5%(W/V) SDS and 0.0625 M tris HCl, pH6.8, for 15 minutes.

Second dimensional discontinuous SDS gel electrophoresis

Separating gel: 12% polyacrylamide(11.7% acrylamide, 0.32% bisacrylamide)
Stacking gel: 4.5% polyacrylamide(4.4% acrylamide, 0.12% bisacrylamide)

Electrophoresis; 20 mA constant current at 4°C.

Fixed in a solution of 50% methanol and 10% acetic acid for 2 hrs.

Stained in a solution of 0.25% Coomassie Blue, 50% methanol and 10% acetic acid for 2 hrs.

Destained in a solution of 10% methanol and 7% acetic acid.

Fig. 2. Method for two-dimensional electrophoresis.

Apo VLDL dissolved in a solution of 0.02 M tris HCl, 8 M urea and 0.01 M dithiothreitol, pH8.2. Gel: 7.7% polyacrylamide(7.5% acrylamide, 0.2% bisacrylamide), 2% ampholine pH4-6.

Focusing was carried out at 4°C and 250 V for 16 hrs.

Fixed in a solution of 5% trichloroacetic acid and 5% sulfosalicylic acid for 2 hrs.

Stained in a solution of 0.1% Coomassie Blue, 10% acetic acid and 45% ethanol for 2 hrs.

Destained in a solution of 10% acetic acid and 25% ethanol.

Scanning at 580 nm and integration of the apo E isoprotein areas.

Fig. 3. Method for isoelectric focusing.

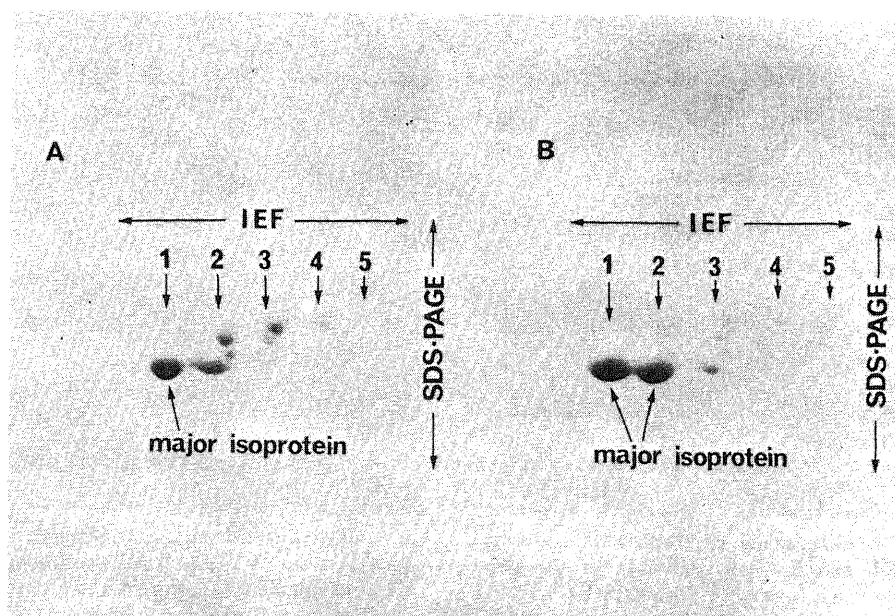


Fig. 4. Two-dimensional electrophoretic patterns of VLDL apo E. Only the gel including apo E is shown. The apo E contains many protein components which are called isoproteins of apo E and differ from each other in isoelectric point and/or molecular weight. One (A, 1) or two (B, 1-2) major isoproteins and other minor isoproteins were observed. A comparison of the apo E isoproteins in panel A and B reveals that apo E components in panel A is greatly diminished. The cathode is on the left, and the anode on the right of the photograph. IEF; isoelectric focusing, SDS-PAGE; SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

るまで脱色した(図3)。次に、島津製作所製分光光度計により、波長 580 nm で吸光度を測定し、アポ蛋白 E イソ蛋白の蛋白量は吸光スペクトルの面積比率から算出した。

7. 統計学的検討

統計学的検討には unpaired Student's *t* testを用いて平均値の有意差検定を行ない、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。なお、成績は、mean \pm SEM で表わした。

成 績

1. 2次元電気泳動法によるアポ蛋白 E のイソ蛋白とその phenotype の検討

1) アポ蛋白 E のイソ蛋白の分離

2次元電気泳動法によりアポ蛋白 E は 8~9 個の

イソ蛋白に分離された(図4)。分子量約 35000 で蛋白量が多い major isoprotein と、それよりも分子量がやや大きく蛋白量が少ない minor isoprotein を認めた。イソ蛋白群は等電点の差から 5 群に分けられた。さらに、major isoprotein が 1 個又は 2 個かにより 2 種類のパターンに分けられた(図4・A・B)。

2) アポ蛋白 E の phenotype の診断

78 例の apo VLDL 中アポ蛋白 E は 6 種類の phenotype に分けられた(図5)。major isoprotein が 1 個のものは、イソ蛋白の等電点の差から、さらに 3 種類に分けられた(図5, E4/4, E3/3, E2/2)。また、major isoprotein が 2 個のものは、その等電点の差から、さらに 3 種類に分けられた(図5, E4/3, E3/2, E4/2)。このことは、さらに 2 例の apo VLDL を混合後泳動することにより、アポ蛋白 E の phenotype の判定は、より

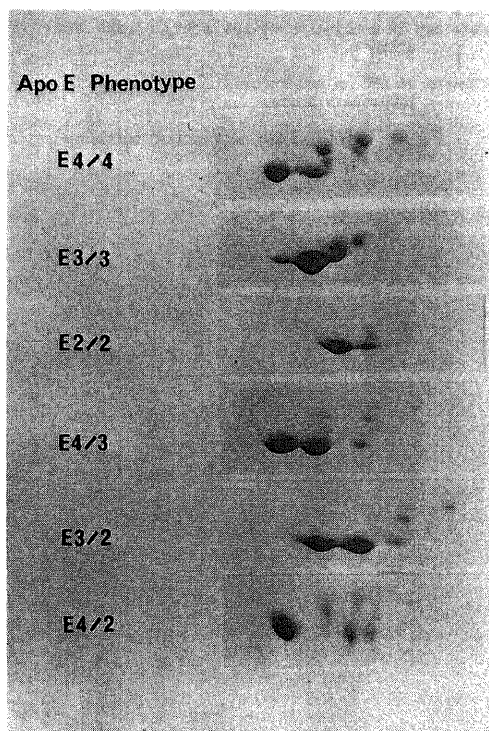


Fig. 5. Two-dimensional electrophoretic patterns of VLDL apo E. Only the area of the gel including apo E is shown. Phenotype E4/4, E3/3 and E2/2 consist of one major isoprotein, while phenotype E4/3, E3/2 and E4/2 consist of two major isoproteins. The mobility of each apo E isoprotein depended on the different apo E phenotypes, but the relative concentrations of isoproteins are preserved. The cathode is on the left, and the anode on the right.

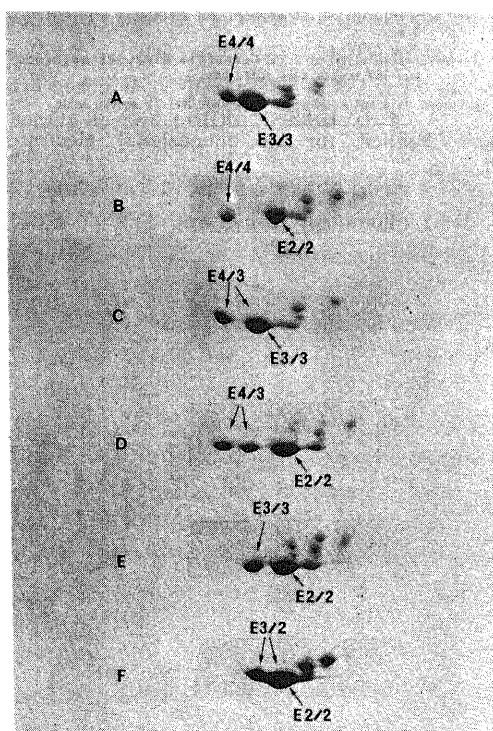


Fig. 6. Two-dimensional electrophoretic patterns of a mixture of VLDL fractions obtained from two individuals with different apo E phenotypes. A, Mixture of phenotype E4/4 and E3/3; B, phenotype E4/4 and E2/2; C, phenotype E4/3 and E3/3; D, phenotype E4/3 and E2/2; E, phenotype E3/3 and E2/2; F, phenotype E3/2 and E2/2. The contribution of each phenotype to the overall pattern is indicated. The cathode is on the left, and the anode on the right.

明確になった。たとえば, major isoprotein が 1 個の phenotype E4/4 と E3/3 の apo VLDL を混合後泳動したとき, 両者のイソ蛋白は一致しなかった (図 6. A)。また, E4/4 と E2/2 の apo VLDL を混合後泳動したときも, 両者のイソ蛋白は一致しなかった (図 6. B)。このように, major isoprotein の等電点の差のみに注目すると, major isoprotein が 1 個のものは 3 種類に分類できることが確認できた。同様に, major isoprotein が 2 個のアポ蛋白 E においても, major isoprotein の等電点の差のみに注目すると, 3 種類に分類できることが確認できた。たとえば, E4/3 と E2/2 の apo VLDL を混合後の泳動像 (図 6. D) と, E3/2 と E2/2 の apo VLDL を混合後の泳動像 (図 6. F) を比較した場合, E4/3 と E3/2 の間で, イソ蛋白に荷電の差を認めることが明らかとなった。アポ蛋白 E の phenotype の表現は Zannis ら²⁹⁾に従い, major isoprotein が 1 個のものは, E4/4, E3/3, E2/2, major isoprotein が 2 個のものは, E4/3, E3/2, E4/2 とした。このように, アポ蛋白 E の phenotype の種類 (6 種) は, phenotype が既知の apo VLDL と混合泳動後に, major isoprotein の数及び等電点の差から容易に判定することができた。

3) 家族性 3 型高脂血症におけるアポ蛋白 E の phenotype について

家族性 3 型高脂血症のアポ蛋白 E の phenotype は, すべて E2/2 であった。phenotype E2/2 の major isoprotein は 1 個であり, その位置は phenotype E4/4, E3/3 よりも酸性側に存在していた (図 6. B. E)。このことは, phenotype E2/2 は他の phenotype に比べより塩基性の蛋白であることを示している。

4) アポ蛋白 E の phenotype と遺伝子頻度

家族性 3 型高脂血症を除く 72 例の apo VLDL についてアポ蛋白 E の phenotype の頻度を検討した (表 1. A)。phenotype E3/3 の頻度が 42% と最も多く, 次いで E4/3, E3/2 が多く認められた。E4/2 と E2/2 は稀な phenotype であった。ところで, アポ蛋白 E の phenotype は 3 種類の常染色体対立遺伝子, $\epsilon 4$, $\epsilon 3$, $\epsilon 2$ の組み合わせから規定されと考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾。すなわち, genotype は $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 2$ と考えられている。今回得られた phenotype の頻度に基づいて遺伝子頻度を算出すると, $\epsilon 3$ の頻度が最も多く, 次いで $\epsilon 4$ が多かった (表 1. B)。

2. アポ蛋白 E の phenotype と高脂血症型との関係

血清 78 例を調べてまとめたが表 2 である。3 型高脂血症の 75% は phenotype E2/2 であったが, 逆に, phenotype E2/2 は, すべて 3 型高脂血症を示した。ま

Table 1. Frequencies of apo E phenotypes(A) and genes(B)

A					
Apo E Phenotype	Apo E Genotype	n	Freq (%)	Germans* (%)	Americans** (%)
E4/4	$\epsilon 4/\epsilon 4$	5	7	3	2
E3/3	$\epsilon 3/\epsilon 3$	30	42	59	49
E2/2	$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0	1	0
E4/3	$\epsilon 4/\epsilon 3$	21	29	22	15
E3/2	$\epsilon 3/\epsilon 2$	15	21	13	31
E4/2	$\epsilon 4/\epsilon 2$	1	1	2	3

B			
Apo E allele	Freq	Germans*	Americans**
$\epsilon 4$	0.22	0.15	0.11
$\epsilon 3$	0.67	0.77	0.72
$\epsilon 2$	0.11	0.08	0.17

* The German population studied by Utermann *et al*²⁹⁾ consisted of 489 normal blood donors; **the American population studied by Zannis *et al*¹⁴⁾¹⁵⁾ consisted of 61 unrelated volunteers; n, number of individuals studied.

Table 2. Apo E phenotype distribution in normal and each type of hyperlipoproteinemic subjects

Apo E Phenotype	Normal	Hyperlipoproteinemia					
		Type 1	Type 2a	Type 2b	Type 3	Type 4	Type 5
E4/4	8.3 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	16.7 (3)	0.0 (0)
E3/3	58.4 (14)	0.0 (0)	35.7 (5)	50.0 (7)	0.0 (0)	22.2 (4)	0.0 (0)
E2/2	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	75.0 (6)	0.0 (0)	0.0 (0)
E4/3	20.8 (5)	0.0 (0)	35.7 (5)	42.9 (6)	0.0 (0)	27.8 (5)	0.0 (0)
E3/2	12.5 (3)	0.0 (0)	28.6 (4)	7.1 (1)	12.5 (1)	33.3 (6)	0.0 (0)
E4/2	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	12.5 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Total % (n)	100.0 (24)	0.0 (0)	100.0 (14)	100.0 (14)	100.0 (8)	100.0 (18)	0.0 (0)

Numbers in parentheses refer to the number of individuals studied.

Table 3. Serum and lipoprotein lipid levels in subjects with each apo E phenotype

Apo E Phenotype	Cholesterol (mg/dl)					Triglyceride (mg/dl)				
	Serum	VLDL	IDL	LDL	HDL	Serum	VLDL	IDL	LDL	HDL
E4/4 (n: 5)	212±10	28±5	10±3	115±8	41±1	184±22	110±13	14±3	24±5	23±4
E3/3 (n: 30)	229±14	26±3	13±2	121±9	41±2	151±15	82±13	14±2	28±2	15±1
E2/2 (n: 6)	355±66	177±67	46±5	55±9	48±2	459±186	347±164	29±5	24±2	28±2
E4/3 (n: 21)	246±18	43±9	21±4	121±15	39±2	243±47	144±38	19±2	39±5	21±2
E3/2 (n: 15)	229±13	37±5	13±2	128±15	42±3	207±31	129±29	11±2	32±5	18±2
E4/2 (n: 1)	313	155	38	63	28	498	331	41	53	23

Numbers in parentheses refer to the number of individuals studied.

た、4型高脂血症では, phenotype E4/4 の頻度が 17% と多い傾向を示した。2a 型, 2b 型高脂血症は健常人と差を認めなかった。

3. アポ蛋白 E の各 phenotype における血清及びリポ蛋白脂質組成

アポ蛋白 E の各 phenotype における血清及びリポ蛋白脂質組成を調べてまとめたのが表 3 である。

1) 血清脂質組成

アポ蛋白 E の各 phenotype における血清脂質組成を比較した (図 7)。血清 Chol は phenotype E2/2 が E3/3, E2/2 に比し有意に高値であった。また, 血清 TG は, phenotype E2/2 が E3/3 に比し高値であり, E4/3 が E3/3 に比し高値であった。

2) リポ蛋白分画の Chol 組成

アポ蛋白 E の各 phenotype におけるリポ蛋白分画

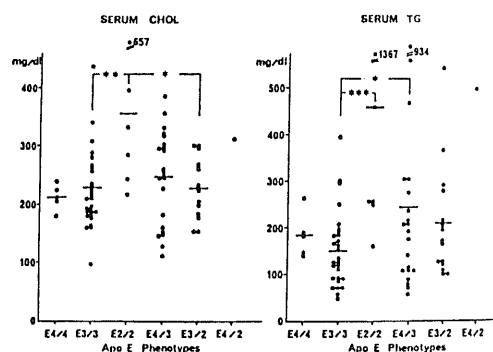


Fig. 7. Serum lipid levels in subjects with each apo E phenotype. Each value (—) indicates mean. The data was statistically significant at a level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

の Chol 組成を比較した (図 8). VLDL-Chol は, phenotype E2/2 が他の phenotype に比し有意に高値であった. IDL-Chol も同様に, phenotype E2/2 が他の phenotype に比し最も高値であった. 一方, LDL-Chol では, phenotype E2/2 が他の phenotype に比し最も低値であった. HDL-Chol については有意な差を認めなかった.

3) リポ蛋白分画の TG 組成

アポ蛋白 E の各 phenotype におけるリポ蛋白分画の TG 組成を比較した (図 9). VLDL-TG は, phenotype E2/2 が E3/3 より高値であった. IDL-TG は, phenotype E2/2 が E3/3, E3/2 に比し高値であった. LDL-TG は, phenotype E4/3 が E3/3 に比し高値であった. HDL-TG については各 phenotype の間で有

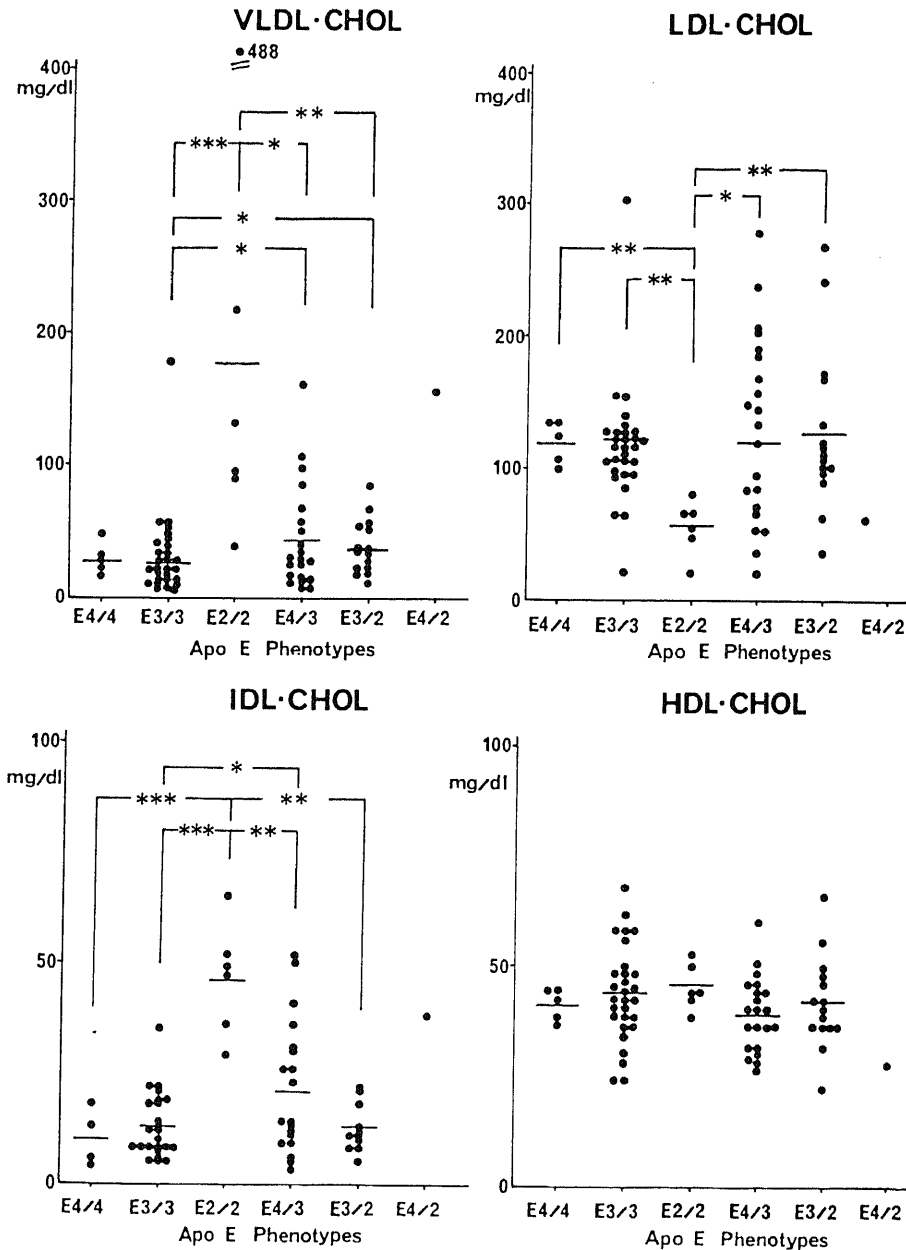


Fig. 8. Lipoprotein cholesterol levels in subjects with each apo E phenotype. Each value (—) indicates mean. The data was statistically significant at a level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

意な差を認めなかった。

4) VLDL-Chol/血清 TG 比と VLDL-Chol/VLDL-TG 比

アポ蛋白 E の各 phenotype において VLDL の脂質組成に異常がないか調べるため VLDL-Chol/血清 TG 比と VLDL-Chol/VLDL-TG 比を検討した。各 phenotype における測定値をまとめたのが表 4 で、各

phenotype を比較したのを図 10 に示した。VLDL-Chol/血清 TG 比と VLDL-Chol/VLDL-TG 比は、ともに phenotype E2/2 が他の phenotype に比し有意に高値であった。すなわち、Chol rich VLDL の特徴を示した。

4. 等電電気泳動法によるアポ蛋白 E のイソ蛋白とその phenotype の検討

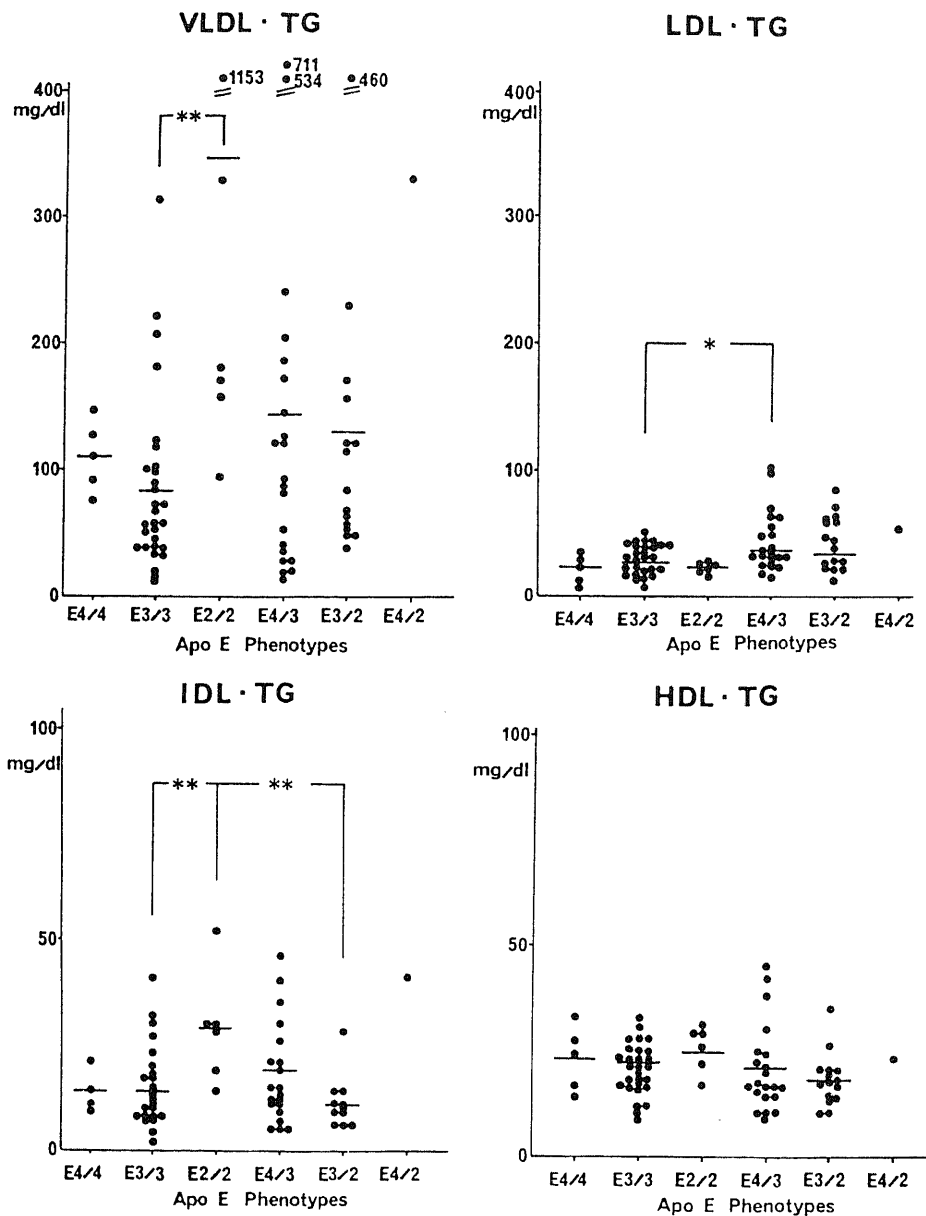


Fig. 9. Lipoprotein triglyceride levels in subjects with each apo E phenotype. Each value (—) indicates mean. The data was statistically significant at a level of *p<0.05 and **p<0.01.

1) アポ蛋白 E phenotype の等電点電気泳動像

等電点電気泳動法により、アポ蛋白 E は 4 本の主要バンドに分離され、陽極側から E1, E2, E3, E4 と命名した(図 11). phenotype E4/4, E3/3, E2/2 では major isoprotein が 1 個存在し、それぞれの major isoprotein は、E4, E3, E2 であった。また、phenotype E4/3, E3/2, E4/2 では major isoprotein が 2 個存在した。major isoprotein は、phenotype E4/3 で E4 と E3, phenotype E3/2 で E3 と E2, phenotype E4/2 で E4 と E2 であった。家族性 3 型高脂血症である phenotype E2/2 は、イソ蛋白 E4 と E3 を認めないことから容易に鑑別できた。また、phenotype E2/2 と E4/2

において、イソ蛋白 E1 より陽極側に 2~3 本のバンドが認められた。

2) アポ蛋白 E の各 phenotype におけるイソ蛋白の組成

アポ蛋白 E の各 phenotype におけるイソ蛋白の組成を検討しまとめたのが表 5 である。

i) イソ蛋白 E4, E3, E2, E1 の組成

アポ蛋白 E の各 phenotype におけるイソ蛋白 E4, E3, E2, E1 の組成を比較した(図 12)。イソ蛋白 E4 では、phenotype E4/4 が E3/3, E3/2 より高値であり、E4/3 が E3/3, E3/2 より高値であった。phenotype E2/2 ではイソ蛋白 E4 を認めなかった。

Table 4. VLDL-Chol/serum TG ratios and VLDL-Chol/VLDL-TG ratios in subjects with each apo E phenotype

Apo E Phenotype	VLDL-Chol/Serum TG	VLDL-Chol/VLDL-TG
E4/4 (n: 5)	0.15±0.01	0.25±0.02
E3/3 (n: 30)	0.16±0.01	0.36±0.03
E2/2 (n: 6)	0.39±0.04	0.56±0.05
E4/3 (n: 21)	0.17±0.01	0.34±0.03
E3/2 (n: 15)	0.18±0.01	0.34±0.03
E4/2 (n: 1)	0.31	0.47

Numbers in parentheses refer to the number of individuals studied.

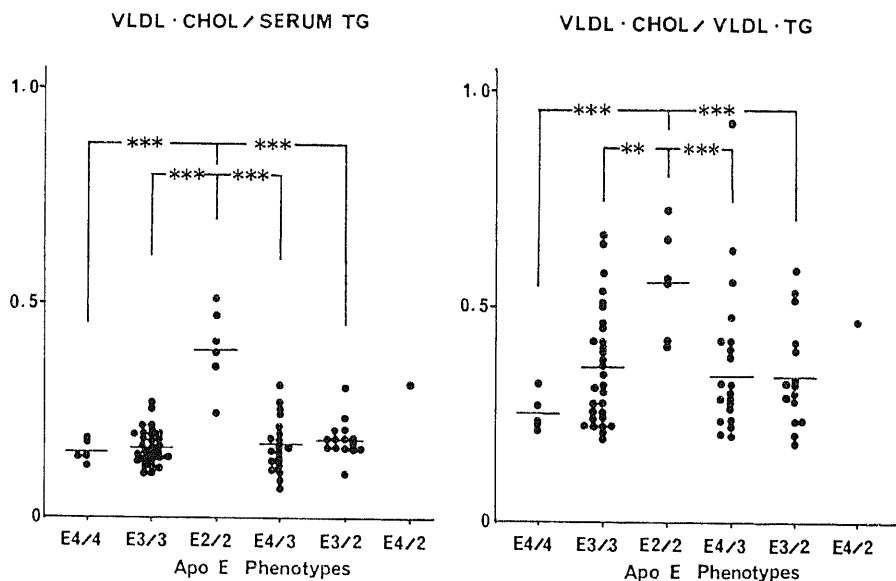


Fig. 10. VLDL-Chol/serum TG and VLDL-Chol/VLDL-TG ratios in subjects with each apo E phenotype. Each value (—) indicates mean. The data was statistically significant at a level of ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

イソ蛋白 E3 では, phenotype E3/3 が E4/4, E4/3, E3/2 より, また, E4/3 が E4/4 より高値であった. phenotype E2/2 ではイソ蛋白 E3 を認めないか, 極めて低値であった.

イソ蛋白 E2 では, phenotype E2/2 が他の phenotype に比し最も高値であった. また, E3/2 が E4/4, E3/3, E4/3 より, E3/3 が E4/4, E4/3 より高値であった.

イソ蛋白 E1 では, phenotype E2/2 が他の phe-

notype に比し最も高値であった. また, E3/2 が E4/4, E4/3, E3/3 より高値であった.

ii) E4/E3 比, E3/E2 比, E2/E1 比

アポ蛋白 E の phenotype の特徴を明らかにするため, イソ蛋白の比を検討した (表 5, 図 13).

E4/E3 比では, phenotype E4/4 が E4/3, E3/2 に比し高値であった. また, phenotype E3/3 が E4/4, E4/3 より高値であった. すなわち, E4/4 と E4/3 の判定において, E4/E3 比が重要であることが明らかとなっ

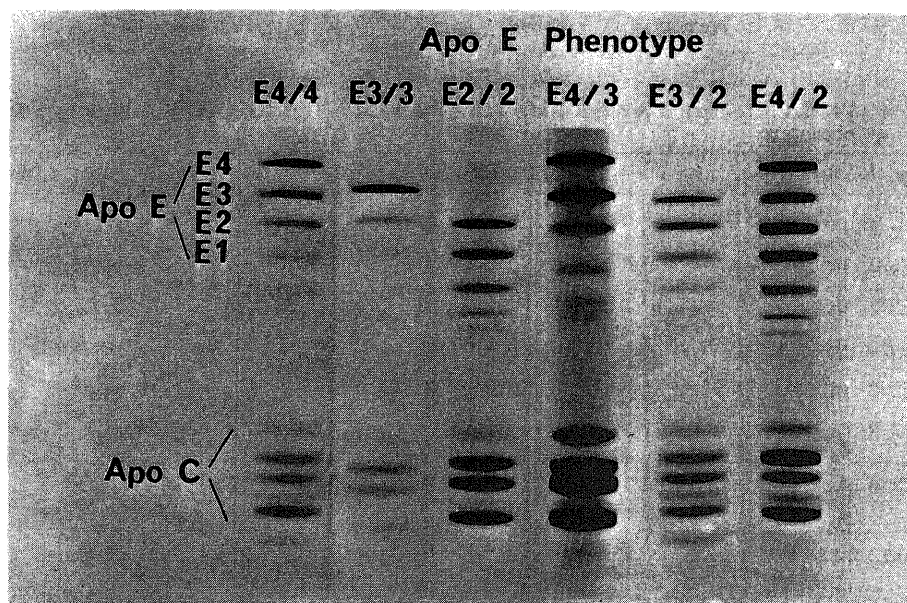


Fig. 11. Isoelectric focusing patterns of six apo VLDL preparations, demonstrating six different apo E phenotypes. Position of E1, E2, E3 and E4 bands were determined by simultaneous analysis of apo E standards. The phenotype was confirmed by two-dimensional electrophoresis. The cathode is on the top, and the anode on the bottom of the gel.

Table 5. Apo E isoprotein E4, E3, E2 and E1 levels, and E4/E3, E3/E2 and E2/E1 ratios in subjects with each apo E phenotype

Apo E Phenotype	E4(%)	E3(%)	E2(%)	E1(%)	E4/E3	E3/E2	E2/E1
E4/4 (n: 5)	34± 5	28±2	23±3	15±4	1.23±0.15	1.28±0.22	2.40±0.86
E3/3 (n: 30)	2± 1	49±2	31±1	19±1	0.06±0.03	1.62±0.09	1.79±0.10
E2/2 (n: 6)	0± 0	0.3±0	56±5	43±5	0.00±0.00	0.01±0.01	1.46±0.29
E4/3 (n: 21)	27± 1	33±1	24±1	16±1	0.84±0.02	1.41±0.09	1.67±0.09
E3/2 (n: 15)	1± 0	32±2	38±1	28±1	0.02±0.02	0.86±0.06	1.40±0.08
E4/2 (n: 1)	31	17	29	23	1.80	0.60	1.26

Numbers in parentheses refer to the number of individuals studied.

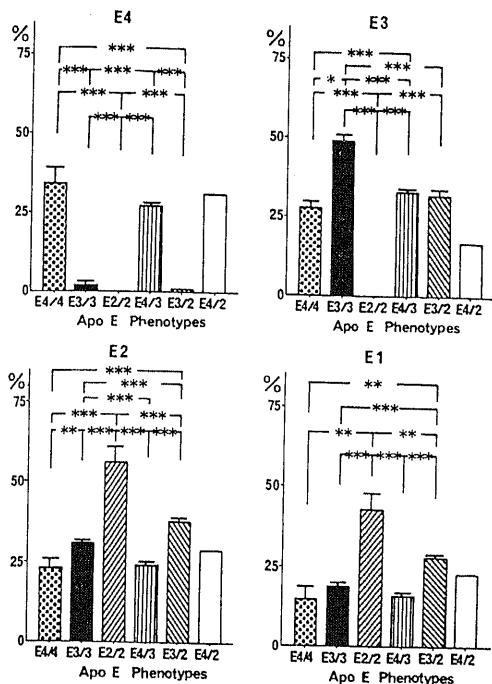


Fig. 12. Apo E isoprotein E4, E3, E2 and E1 levels in subjects with each apo E phenotype. Each value indicates mean \pm SEM. The data was statistically significant at a level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

た。

E3/E2 比では, phenotype E2/2 が他の phenotype に比し最も低値であり, これは E2/2 においてイソ蛋白 E3 が認められないか, 極めて低値であることを示している. また, E3/2 が E4/4, E3/3, E4/3 より低値であった。

E2/E1 比では, phenotype E3/3 と E4/3 が, それぞれ E3/2 より高値であった。

5. 等電電気泳動法によるアポ蛋白 E の phenotype の判定

等電電気泳動法による泳動パターンからアポ蛋白 E の phenotype を決定し, また, 2 次元電気泳動法により同じサンプルから phenotype を判定した. phenotype E2/2 はイソ蛋白 E4 と E3 を認めないことから容易に判定できた. また, phenotype E4/2 はイソ蛋白 E4 と E2 の 2 個の major isoprotein を認めることから識別した. しかし, 18% の症例で phenotype E4/4 と E4/3, または, E3/3 と E3/2 の鑑別が困難であった. そこでイソ蛋白の組成を比較した.

1) phenotype E4/4 と E4/3 のアポ蛋白 E イソ蛋白の特徴

phenotype E4/4 と E4/3 において, イソ蛋白 E4 と E4/E3 比について検討した (図 14). phenotype E4/4 と E4/3 では, イソ蛋白 E4 は 18.0% よりも高値で

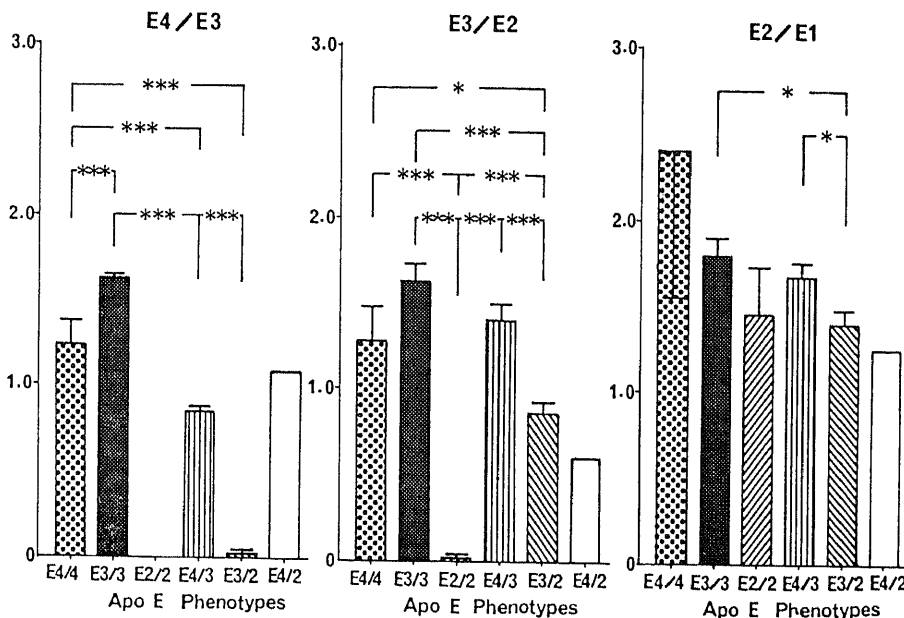


Fig. 13. Apo E isoprotein E4/E3, E3/E2 and E2/E1 ratios in subjects with each apo E phenotype. Each value indicates mean \pm SEM. The data was statistically significant at a level of * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

あった。E4/E3 比の分布をみると、E4/E3 比 1.1 を境界として phenotype E4/4 と E4/3 が分けられた。phenotype E4/4 では、E4/E3 比は 1.1 よりも高値であった。すなわち、phenotype E4/4 と E4/3 は E4/E3 比により鑑別されることが明らかとなった。

2) phenotype E3/3 と E3/2 のアポ蛋白 E イソ蛋白の特徴

phenotype E3/3 と E3/2 において、イソ蛋白 E3 と E3/E2 比について検討した (図 15)。phenotype E3/3

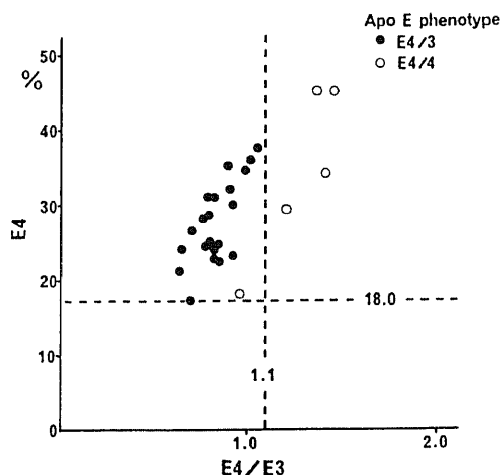


Fig. 14. The distribution of the apo E isoprotein E4 and the E4/E3 ratio in subjects with apo E phenotype E4/4 and E4/3.

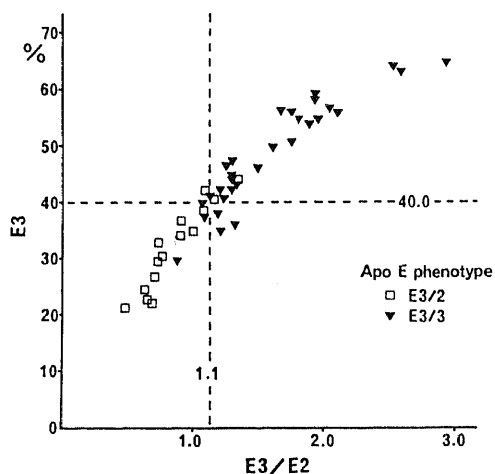


Fig. 15. The distribution of the apo E isoprotein E3 and the E3/E2 ratio in subjects with apo E phenotype E3/3 and E3/2.

において、イソ蛋白 E3 は 39.5% より高値で、E3/E2 比は 1.1 より高値であった。逆に、phenotype E3/2 において、イソ蛋白 E3 は 39.5% より低値で、E3/E2 比は 1.1 より低値であった。このように、イソ蛋白 E3 と E3/E2 比により、phenotype E3/3 と E3/2 が鑑別された。

結局、等電点電気泳動法により泳動パターンとイソ蛋白の組成を検討することにより、92% の症例でアポ蛋白 E の phenotype の鑑別が可能になった。

考 察

Havel ら²⁶⁾²⁷⁾は、家族性 3 型高脂血症において、血中アポ蛋白 E が増加していることを報告し、本症とアポ蛋白 E との関連性をはじめて明らかにした。Utermann ら¹²⁾は、等電点電気泳動法によりアポ蛋白 E を検討し、家族性 3 型高脂血症において、イソ蛋白 E3 が欠損していることを報告した。その後、Zannis ら¹³⁻¹⁵⁾は、アポ蛋白 E をはじめて 2 次元電気泳動法により検討し、アポ蛋白 E が 6 種類の phenotype に分類され、家族性 3 型高脂血症のアポ蛋白 E の異常はイソ蛋白の欠損ではなく、蛋白の荷電の異常により陽極に偏位したものであると報告した。

今回、著者は 2 次元電気泳動法によりアポ蛋白 E のイソ蛋白とその phenotype について検討した。著者ら²⁸⁾は、アポ蛋白 E が約 9 個のイソ蛋白に分離され、1 個又は 2 個の major isoprotein を認めることを既に報告した。78 例のアポ蛋白 E を検討したところ、Zannis ら¹³⁻¹⁵⁾の報告と同様に 6 種類の phenotype に分けられた。アポ蛋白 E の phenotype は、phenotype が既知の apo VLDL と混合泳動後、major isoprotein の数及び等電点の差から容易に決定された。すなわち、major isoprotein が 1 個である phenotype E4/4、E3/3、E2/2 と、major isoprotein が 2 個である phenotype E4/3、E3/2、E4/2 に分けられた。家族性 3 型高脂血症のアポ蛋白 E phenotype は、すべて E2/2 を示し、major isoprotein が 1 個で、その位置は phenotype E4/4、E3/3 よりも陽極に偏位していた。

72 例のアポ蛋白 E phenotype の内訳では、E3/3 が最も多く、ついで、E4/3、E3/2 が多く、E4/2、E2/2 は稀であった。この結果は欧米の報告¹⁴⁾¹⁵⁾²⁹⁾と同様であった (表 1. A)。Utermann ら²⁹⁾、Zannis ら¹⁴⁾¹⁵⁾の遺伝学的検討から、アポ蛋白 E phenotype は 3 種類の常染色体対立遺伝子、 ϵ_4 、 ϵ_3 、 ϵ_2 により規定されると考えられている。すなわち、phenotype E4/4、E3/3、E2/2、E4/3、E3/2、E4/2 の genotype は、それぞれ、 ϵ_4/ϵ_4 、 ϵ_3/ϵ_3 、 ϵ_2/ϵ_2 、 ϵ_4/ϵ_3 、 ϵ_3/ϵ_2 、 ϵ_4/ϵ_2 となる。今回の結果から遺伝子頻度を算出すると、欧米の報

告¹⁴⁾¹⁵⁾²⁹⁾と大きな差を認めず、 $\epsilon 3$ が最も多く、 $\epsilon 2$ が最も少ない頻度であった(表1・B)。

アポ蛋白E phenotypeと高脂血症型の関係を検討すると、3型高脂血症の75%がphenotype E2/2であり、逆に、phenotype E2/2を示すものは、すべて3型高脂血症であった。また、phenotype E4/4において4型高脂血症の頻度が多かった。Ghiselliら³⁰⁾は、5型高脂血症において、phenotype E4/4、E4/3、E4/2の頻度が多いことを報告している。このことはアポ蛋白E4がTG rich lipoproteinの代謝に関係することを示唆している。

血清リポ蛋白組成を検討したところ、phenotype E2/2ではVLDLとIDLのCholの増加と、VLDL-Chol/血清TG比とVLDL-Chol/VLDL-TG比の増加が認められ、Chol rich VLDLの特徴を示した。また、LDL-Cholの著明な低下を認めた。従来から、家族性3型高脂血症の診断は、 β -VLDLの証明とChol rich VLDLの特徴によりなされてきた。家族性3型高脂血症の診断基準として、Fredricksonら¹⁶⁾は、VLDL-Chol/血清TG比 ≥ 0.30 なら確実、 ≥ 0.25 なら疑いありとし、また、馬淵ら¹⁷⁾はVLDL-Chol ≥ 55 mg/dl、VLDL-Chol/VLDL-TG比 ≥ 0.33 なら確実と報告している。しかし、糖尿病³¹⁾³²⁾、ネフローゼ症候群³³⁾、ホルモンの関与³⁴⁾³⁵⁾などで2次性3型高脂血症をきたすことがある。このことから上記のような診断基準は家族性3型高脂血症の確実なgenetic markerとはいえない。Utermannら³⁶⁾は、家族性3型高脂血症は本来、血清脂質は正常か、または低値であり、phenotype E2/2に他の高リポ蛋白血症の遺伝子が重なったり、環境因子、特にホルモンの関与、食事内容の影響により3型高脂血症によると報告している。これを支持する報告として、Breslowら³⁷⁾は、phenotype E2/2のリポ蛋白の特徴はLDL-Cholの低下とVLDL-Chol/血清TG比の増加であるといい、Wardellら³⁸⁾は、血清Cholの低下のみであるといっている。また、若杉ら³⁹⁾は、血清脂質が正常であるphenotype E2/2の症例を報告している。

家族性3型高脂血症は早発性の冠および末梢動脈硬化症をきたす疾患である。皮膚には手掌線状黄色腫又は発疹性黄色腫を認めることが多い。近年、冠動脈硬化症に対してHDLは抑制的に、LDLは促進的に働くことが実験的、疫学的研究から多数報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾。また、IDLが動脈硬化促進作用があることも報告されており、多々見⁴⁴⁾は、IDLまたはChol rich VLDLが独立した動脈硬化危険因子になると報告している。今回、家族性3型高脂血症で認められたIDLとChol rich VLDLの増加は動脈硬化を促進させると

考えられる。

2次元電気泳動法により、アポ蛋白E phenotypeは容易に判定できた。しかし、2次元電気泳動法は非常に精度の高い分離法であるが方法が複雑で日常臨床にはむかない。その反面、等電点電気泳動法は比較的簡単な方法といえる。等電点電気泳動法によるアポ蛋白E phenotypeの検討は欧米で報告が多いが、日本での検討は少ない。また、等電点電気泳動法によるアポ蛋白E phenotypeの判定に関する報告は少なく、2次元電気泳動法と比較したものは1報⁴⁵⁾のみである。今回、等電点電気泳動法により、アポ蛋白Eの泳動パターンから82%の症例でphenotypeの判定が可能であった。しかし、phenotype E4/4とE4/3、さらにE3/3とE3/2の鑑別が困難な例も認めた。そこで、泳動パターン以外にイソ蛋白の組成から鑑別が可能かどうか検討した。その結果、phenotype E4/4とE4/3はイソ蛋白E4/E3比により、また、E3/3とE3/2はイソ蛋白E3とE3/E2比により鑑別できた。したがって、イソ蛋白の組成を検討することにより92%の症例でアポ蛋白E phenotypeの判定が可能となった。Ghiselliら⁴⁶⁾は、等電点電気泳動法により91%が診断でき、残り9%は2次元電気泳動法による検討が必要であると報告している。また、Wardellら³⁸⁾は、等電点電気泳動法により100%診断できると報告しているが、彼らは2次元電気泳動法による検討をしていない。Bouthillierら⁴⁵⁾は、著者と同様に等電点電気泳動法と2次元電気泳動法を比較し、99%で診断できると報告している。今回の検討から、等電点電気泳動法により、アポ蛋白Eの泳動パターンとイソ蛋白の組成からphenotypeの判定が可能であることが明らかとなった。

最近、Rallら⁴⁷⁾によりアポ蛋白Eのアミノ酸構造が解明された。アポ蛋白E2、E3、E4の荷電の差はシステイン(cysteine)とアルギニン(arginine)の変換によることが明らかとなった。すなわち、アポ蛋白Eは299個のポリペプチドで、アポ蛋白E3はN末端から112番目がシステイン、145と158番目はアルギニンであるが(Cys₁₁₂Arg₁₄₅Arg₁₅₈)、アポ蛋白E4は112番目のシステインがアルギニンに変換し(Arg₁₁₂Arg₁₄₅Arg₁₅₈)、アポ蛋白E2は158番目のアルギニンがシステインに変換していた(Cys₁₁₂Arg₁₄₅Cys₁₅₈)。

ヒトの末梢細胞(動脈壁平滑筋細胞、皮膚線維芽細胞)にはアポ蛋白BとEが結合するアポB・Eレセプターが存在する⁴⁸⁾。一方、肝にはアポB・Eレセプター以外に、アポ蛋白Eだけが結合するアポEレセプターが存在する⁴⁹⁾。アポ蛋白Eを多く含むレムナントやHDLc(Cholとアポ蛋白Eを多く含む特殊なHDL)が肝に急速に取り込まれることが明らかにされてい

る¹⁰¹¹。すなわち、レムナントやHDLcは肝のアポEレセプターを介して代謝されると考えられる。ラットおよびヒトにおいて、アポ蛋白E2の代謝が他のアポ蛋白E3、E4に比べ著明に低下していることが証明されている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。また、Weisgraberら⁵¹⁾は、アポ蛋白E2と皮膚線維芽細胞のアポB・Eレセプターとのbindingが著明に低下していることを明らかにした。Ghiselliら⁵²⁾、馬淵ら⁵³⁾は、アポ蛋白Eが全く欠損している症例を報告し、カイロミクロンのレムナントの代謝が障害されていることを報告している。このように、家族性3型高脂血症の成因は、アポ蛋白Eのアミノ酸構造の異常により肝でのアポEレセプターを介するレムナントの代謝が障害されるためと考えられる。

アポB・Eレセプターとのbindingが正常であるphenotype E2/2の症例が報告された⁵⁴⁾。アミノ酸組成の検討から、アポ蛋白E2の145番目のアルギニンがシスチンに変換していた(Cys₁₁₂Cys₁₄₅Arg₁₅₈)⁵⁴⁾。このような症例に対し、新しい遺伝子 $\epsilon 2^*$ が考えられ、新しいphenotypeとして、bindingが正常であるE2*/E2*と、中間の値を示すE2*/E2が存在する⁵⁴⁾。このことから、シスチン・アルギニン変換は3ヶ所でおこり、4つの遺伝子、 $\epsilon 4$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 2^*$ が存在すると思われる。

最近、新しいアポ蛋白E phenotypeが報告された⁵⁵⁻⁵⁷⁾。1つは、アポ蛋白E Bethesdaであり、アポ蛋白E1の位置に認められる蛋白で3型高脂血症をきたす⁵⁵⁾。また、3型高脂血症をきたすphenotype E3/2も報告⁵⁶⁾され、これは新しいアポ蛋白E2の異型である。日本においては、Yamamuraら⁵⁷⁾はアポ蛋白E5という新しいアポ蛋白Eを報告し、これはアポ蛋白E4よりも陰極側に認められる蛋白である。

家族性3型高脂血症の成因は、アポ蛋白Eのアミノ酸組成の異常によりレムナントの代謝障害がおこると考えられる。しかし、3型高脂血症をきたすアポ蛋白Eはheterogeneityを示し、新しいphenotypeも存在する。また、アポ蛋白E以外の他の因子も発現に関与していると考えられる。このことから、家族性3型高脂血症の成因を解明するためには、アポ蛋白Eのみならず、レセプターおよび他の因子との関係について検討する必要がある。

結 論

家族性3型高脂血症の成因に関する研究として、2次元電気泳動法と等電点電気泳動法を用い、アポ蛋白Eのイソ蛋白とそのphenotypeを検討し、次の結果を得た。

1. 72例のアポ蛋白Eのphenotypeを調べた結

果、E4/4=7%、E3/3=42%、E2/2=0%、E4/3=29%、E3/2=21%、E4/2=1%であった。遺伝子頻度は $\epsilon 4=0.22$ 、 $\epsilon 3=0.67$ 、 $\epsilon 2=0.11$ であった。

2. 家族性3型高脂血症6例のアポ蛋白E phenotypeはすべてE2/2であり、最も陽極に偏位する蛋白であった。phenotype E2/2はすべて3型高脂血症を示した。phenotype E4/4において4型高脂血症の頻度が多かった。

3. 血清リポ蛋白組成では、phenotype E2/2において、VLDLとIDLのCholの増加と、VLDL-Chol/血清TG比とVLDL-Chol/VLDL-TG比の増加を示した。また、LDL-Cholが低下していた。

4. 等電点電気泳動法によるアポ蛋白Eの泳動パターンとイソ蛋白の検討から、92%のアポ蛋白E phenotypeの鑑別が可能であった。phenotype E4/4とE4/3はE4/E3比により鑑別された。また、phenotype E3/3とE3/2はイソ蛋白E3とE3/E2比により鑑別された。E2/2はイソ蛋白E4とE3を認めないことから判別できた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また、本研究を当初より御指導、御教示頂いた馬淵宏助教授に心から謝意を表します。さらに、御協力頂きました当教室第1研究室の諸先生方に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第13回、第15回日本動脈硬化学会総会において発表した。

文 献

- 1) Fredrickson, D. S., Levy, R. I. & Lees, R. S.: Fat transport in lipoproteins — an integrated approach to mechanisms and disorders. *N. Engl. J. Med.*, 276, 215-225(1976).
- 2) Fredrickson, D. S., Levy, R. I. & Lindgren, F. T.: A comparison of heritable abnormal lipoprotein patterns as defined by two different techniques. *J. Clin. Invest.*, 47, 2446-2457(1968).
- 3) Hazzard, W. R., Porte, Jr. D. & Bierman, E. L.: Abnormal lipid composition of very low density lipoproteins in diagnosis of broad beta disease (type III hyperlipoproteinemia). *Metabolism*, 21, 1009-1014 (1972).
- 4) Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Fredrickson, D. S.: Familial type 3 hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia), p655-671, J. B. Stanburg, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein & M. S. Brown (ed.), *The Metabolic Basis*

- of Inherited Disease, Chap. 32, 5th ed. McGraw-Hill, New York, 1983.
- 5) Hazzard, W. R. & Bierman, E. L.: Broad- β disease versus endogenous hypertriglyceridemia; levels and lipid composition of chylomicrons and very low density lipoproteins during fat-free feeding and alimentary lipemia. *Metabolism*, **24**, 817-828 (1975).
- 6) Hazzard, W. R. & Bierman, E. L.: The spectrum of electrophoretic mobility of very low density lipoproteins; role of slower migrating species in endogenous hypertriglyceridemia (Type IV hyperlipoproteinemia) and broad- β disease (type III). *J. Lab. Clin. Med.*, **86**, 239-252 (1975).
- 7) Hazzard, W. R. & Bierman, E. L.: Delayed clearance of chylomicron remnants following vitamin-A-containing oral fat loads in broad- β disease (type III hyperlipoproteinemia). *Metabolism*, **25**, 777-801 (1976).
- 8) Chait, A., Hazzard, W. R., Albers, J. J., Kushwaha, R. P. & Brunzell, J. D.: Impaired very low density lipoprotein and triglyceride removal in broad beta disease; comparison with endogenous hypertriglyceridemia. *Metabolism*, **27**, 1055-1065 (1978).
- 9) Shore, B. & Shore, V.: Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*, **12**, 502-507 (1973).
- 10) Sherrill, B. C., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.: Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. Identity with the chylomicron remnant transport process. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1804-1807 (1980).
- 11) Hui, D. Y., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.: Lipoprotein binding to canine hepatic membranes; Metabolically distinct apo E and apo B, E receptors. *J. Biol. Chem.* **256**, 5646-5655 (1981).
- 12) Utermann, G., Jaeshke, M. & Menze, J.: Familial hyperlipoproteinemia type III, deficiency of a specific apolipoprotein (apo E-III) in the very-low-density lipoproteins. *FEBS Lett.*, **56**, 352-355 (1975).
- 13) Zannis, V. I. & Breslow, J. L.: Characterization of a unique human apolipoprotein E variant associated with type III hyperlipoproteinemia. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1759-1762 (1980).
- 14) Zannis, V. I. & Breslow, J. L.: Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. *Biochemistry*, **20**, 1033-1041 (1981).
- 15) Zannis, V. I., Just, P. W. & Breslow, J. L.: Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Genet.*, **33**, 11-14 (1981).
- 16) Fredrickson, D. S., Morganroth, J. & Levy, R. I.: Type III hyperlipoproteinemia; An analysis of two contemporary definitions. *Ann. Int. Med.*, **82**, 150-157 (1975).
- 17) 馬淵宏・羽場利博・亀谷富夫・太田正之・宮元進・伊藤清吾・多々見良三・小泉順二・上田良成・上田幸生・竹田亮祐: III型高脂血症の診断に関する研究—VLDL-CholとVLDL-Chol/VLDL-TG比について—*日本老年医学会雑誌*, **14**, 50-59 (1977).
- 18) Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 19) Noble, R. P.: Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose. *J. Lipid Res.*, **9**, 693-700 (1968).
- 20) Beaumont, J. L., Carlson, L. A., Cooper, G. R., Fejfan, Z., Fredrickson, D. S. & Strasser, T.: Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Bull. WHO.*, **43**, 891-908 (1970).
- 21) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. & Fu, P. C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 22) Fletcher, M. J.: A colorimetric method for the estimation of serum triglycerides. *Clin. Chem. Acta.* **22**, 393-397 (1968).
- 23) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
- 24) Warnick, G. R., Mayfield, C., Albers, J. J. & Hazzard, W. R.: Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin. Chem.*, **25**, 279-284 (1979).
- 25) Zannis, V. I., Breslow, J. L., Utermann, G., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Havel, R. J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Schonfeld, G.,

- Hazzard, W. R. & Blum, C.: Proposed nomenclature of apo E isoproteins, apo E genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.*, **23**, 911-914 (1982).
- 26) Havel, R. J. & Kane, J. P.: Primary dysbetalipoproteinemia; predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2015-2019 (1973).
- 27) Havel, R. J., Kotite, L., Vigne, J. L., Kane, J. P., Tun, P., Phillips, N. & Chen, G. C.: Radioimmunoassay of human arginine-rich apolipoprotein (apoprotein E); Concentration in blood plasma and lipoproteins as affected by apoprotein E3 deficiency. *J. Clin. Invest.*, **66**, 1351-1362 (1980).
- 28) 渡辺彰・酒井泰征・坂井健志・吉村陽・若杉隆伸・多々見良三・羽場利博・上田幸生・小泉順二・宮元進・馬淵宏・竹田亮祐: 二次元ポリアクリルアミド電気泳動法を用いたアポ蛋白 E の isoprotein の検討. 動脈硬化, **10**, 99-104 (1982).
- 29) Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U. & Weber, W.: Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 339-347 (1980).
- 30) Ghiselli, G., Schaefer, E. J., Zech, L. A., Gregg, R. E. & Brewer, Jr. H. B.: Increased prevalence of apolipoprotein E4 in type V hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.*, **70**, 474-477 (1982).
- 31) 上田幸生・多々見良三・上田良成・亀谷富夫・羽場利博・伊藤清吾・小泉順二・太田正之・宮元進・喜多徹・馬淵宏・竹田亮祐: 3型高脂血症を伴った糖尿病性昏睡の3例. 糖尿病, **21**, 471-480 (1978).
- 32) 竹越忠美・亀谷富夫・追分久憲・井村優・竹内伸夫・篠崎公秀・西野知一・上田幸生・宮元進・馬淵宏: III型高リポ蛋白血症, 下肢動脈血栓, 心筋梗塞を伴った糖尿病の1症例. 糖尿病, **23**, 1137-1145 (1980).
- 33) 上田幸生・渡辺彰・川上究・上野秀明・馬淵宏・竹田亮祐: III型高脂血症を呈したネフローゼ症候群の2例. 内科, **50**, 973-978 (1982).
- 34) 上田良成・藤村昭夫・木越俊和・本定晃・多々見良三・上田幸生・宮元進・馬淵宏・竹田亮祐・長野喬: ステロイド投与により3型高脂血症を併発した皮膚筋炎の1例. 内科, **48**, 1034-1038 (1981).
- 35) 亀谷富夫・多々見良三・上田良成・上田幸夫・羽場利博・伊藤清吾・小泉順二・太田正之・宮元進・上田操・馬淵宏・元田憲・斎藤善蔵・竹田亮祐: Sheehan症候群発症後に黄色腫, 冠動脈狭窄の進展をきたしたと思われるIII型高脂血症の1例. 日本内科学会雑誌, **66**, 552-557 (1977).
- 36) Utermann, G., Pruin, N. & Steinmetz, A.: Polymorphism of apolipoprotein E; III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin. Genet.*, **15**, 63-72 (1979).
- 37) Breslow, J. L., Zannis, V. I., SanGiacomo, T. R., Third, L. L. H. C., Tracy, T. & Glueck, C. J.: Studies of familial type 3 hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apo E phenotype E2/2. *J. Lipid Res.*, **23**, 1224-1235 (1982).
- 38) Wardell, M. R., Suckling, P. A. & Janus, E. D.: Genetic variation in human apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*, **23**, 1174-1182 (1982).
- 39) 若杉隆伸・酒井泰征・吉村陽・坂井健志・渡辺彰・多々見良三・上田幸生・馬淵宏・竹田亮祐: Normolipidemic dysbetalipoproteinemia (apo E-3欠損症) の4例. 動脈硬化, **10**, 1031-1040 (1983).
- 40) Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Hulley, S. B., Kagan, A. & Zukel, W. J.: HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation*, **55**, 767-772 (1977).
- 41) Rhoads, G. G., Gulbrandsen, C. L. & Kagan, A.: Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 293-298 (1976).
- 42) Kannel, W. B., Castelli, W. P. L. & Gordon, T.: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease; New perspectives based on the Framingham study. *Ann. Intern. Med.*, **90**, 85-91 (1979).
- 43) Miller, M. E., Thelle, D. S. & Forde, O. H.: The Tromso heart study; High density lipoprotein and coronary heart disease; A prospective case control study. *Lancet*, **1**, 965-967 (1977).
- 44) 多々見良三: 冠動脈造影所見に基づく冠動脈硬化度と中間比重リポ蛋白との関連について. 十全医会誌, **88**, 631-646 (1979).
- 45) Bouthillier, D., Sing, C. F. & Davignon, J.: Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method; application to the study of informative matings. *J. Lipid Res.*, **24**, 1060-1069 (1983).
- 46) Ghiselli, G., Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J. & Brewer, Jr. H. B.: Phenotype study of apolipoprotein E isoforms in hyperlipoproteinemic patients. *Lancet*, **2**, 405-407 (1982).
- 47) Rall, S. C. Jr., Weisgraber, K. H. & Mahley,

R. W.: Human apolipoprotein E; The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, **257**, 4171-4178 (1982).

48) Mahley, R. W., Hui, D. Y., Innerarity, T. L. & Weisgraber, K. H.: Two-independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine and man; Apo-B, E and apo-E receptors. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1197-1206 (1981).

49) Havel, R. J., Chao, Y., Windler, E. E., Kotite, L. & Guo, L. S. S.: Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4349-4353 (1980).

50) Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J. & Brewer, Jr. H. B.: Type III hyperlipoproteinemia; Defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science*, **211**, 584-586 (1981).

51) Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.: Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2518-2521 (1982).

52) Ghiselli, G., Schaefer, E. J., Gascon, P. & Brewer, Jr. H. B.: Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science*, **214**, 1239-1241 (1981).

53) 馬淵宏・武田三昭・伊藤英章・若杉隆伸・坂井健志・酒井泰征・吉村陽・道下一朗・嘉門信雄・渡辺彰・小泉順二・竹田亮祐・麻上千鳥: Apolipoprotein E Absence の1例. 日本動脈硬化学会昭和58年度冬季大会プログラム, 24 (1983).

54) Rall, Jr. S. C., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.: Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4696-4700 (1982).

55) Gregg, R. E., Ghiselli, G. & Brewer, Jr. H. B.: Apolipoprotein E Bethesda; A new variant of apolipoprotein E associated with type III hyperlipoproteinemia. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**, 969-974 (1983).

56) Rall, Jr. S. C., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L., Bersot, T., Mahley, R. W. & Blum, C. B.: Identification of a new structural variant of human apolipoprotein E, E2 (Lys₁₄₆-Gln), in a type III hyperlipoproteinemic subject with the E3/2 phenotype. *J. Clin. Invest.*, **72**, 1288-1297 (1983).

57) Yamamura, T., Yamamoto, A., Hiramori, K. & Nambu, S.: A new isoform of apolipoprotein E - Apo E5 - associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **50**, 159-172 (1984).

Study of Apolipoprotein E Isoproteins and Phenotypes by Two-dimensional Electrophoresis and Isoelectric Focusing Methods Akira Watanabe, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Jusen Med. Soc.*, **94**, 685-702 (1984)

Key words: familial type 3 hyperlipoproteinemia, apolipoprotein E, two-dimensional electrophoresis, isoelectric focusing

Abstract

The present study was performed to examine apolipoprotein E (apo E) isoproteins and phenotypes by two-dimensional electrophoresis and isoelectric focusing methods. Twenty-four normal subjects, 48 hyperlipoproteinemic patients and 6 patients with familial type 3 hyperlipoproteinemia were studied. The mean age of the patients was 48 ± 11 (SD) years. The very low density lipoprotein (VLDL) purified by ultracentrifugation was analysed. Two-dimensional electrophoresis analysis revealed many apo E isoproteins differing from each other in both size and charge. The patterns of apo E isoproteins showed six phenotypes referred to as E4/4, E3/3, E2/2, E4/3, E3/2 and E4/2. All six patients with familial type 3 hyperlipoproteinemia exhibited phenotype E2/2. Among the 72 subjects (normal and hyperlipoproteinemic), the apo E phenotypes were found in the following frequencies: E4/4, 7%; E3/3, 42%; E2/2, 0%; E4/3, 29%; E3/2,

21%; and E4/2, 1%. According to the currently accepted genetic model, human apo E is specified at a single gene locus with three alleles, $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 2$. Individuals homozygous for these alleles have the apo E phenotypes E4/4, E3/3 and E2/2, respectively. Heterozygotes for these alleles have the apo E phenotypes E4/3, E3/2 and E4/2, which correspond to genotypes $\epsilon 4/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 2$ and $\epsilon 4/\epsilon 2$, respectively. On this basis, the alleles occurred at a frequency of 0.22 for the $\epsilon 4$ allele, 0.67 for the $\epsilon 3$ allele, and 0.11 for the $\epsilon 2$ allele. Seventy-five percent of type 3 hyperlipoproteinemic patients had an E2/2 phenotype. Among type 4 hyperlipoproteinemic patients, 17 percent had an E4/4 phenotype. Analysis of the lipoprotein lipid levels in subjects with each apo E phenotype demonstrated that patients with apo E phenotype E2/2 had the highest VLDL-Chol level, IDL-Chol level, VLDL-Chol/VLDL-TG ratio and the lowest LDL-Chol level. Isoelectric focusing analysis revealed at least 4 isoproteins of apo E. By the isoelectric focusing method, six apo E phenotypes were also distinguished by the relative proportions of apo E isoforms. There was a 92% agreement between the data obtained by the isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis methods, respectively. Apo E phenotype E2/2 showed apparent deficiencies of E4 and E3 isoproteins. Furthermore, phenotype E4/2 showed that E4 and E2 isoproteins formed prominent isoforms in a similar concentration. Apo E phenotype E4/4 was distinguished from phenotype E4/3 by an E4/E3 ratio higher than 1.1. Apo E phenotype E3/3 was distinguished from phenotype E3/2 by an E3 isoprotein level higher than 39.5% and an E3/E2 ratio higher than 1.1. These data suggest that the isoelectric focusing method is simple and able to determinate six apo E phenotypes.